

УДК 543.429.23:616-073.584

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ, МЕТАБОНОМИКА И БИОФАРМАЦЕВТИКА

*Н.М. Сергеев, К.Ф. Шеберстов,
В.Н. Торочешников, Н.Д. Сергеева*

Аннотация

Проанализированы основные области применения спектроскопии ЯМР высокого разрешения для исследования метабономических профилей биологических жидкостей. Даны сравнительные характеристики различных методов изучения состава биологических жидкостей с точки зрения чувствительности и селективности. Показано, что метод ЯМР может эффективно использоваться в фармацевтике при выяснении подлинности лекарственных препаратов и при поиске примесей.

Ключевые слова: ЯМР, метабономика, фармацевтика.

Введение

В последние годы возникло новое научное направление – метабономика. Вместе с другими науками – геномикой, протеомикой, транскриптомикой – метабономика входит в число так называемых *омик-наук*. Метабономика определяется как изучение на молекулярном уровне реакции живого организма на различные патофизиологические влияния (болезни, диеты, токсические и возрастные эффекты, реакции на прием лекарств и т. д.). Именно молекулярный подход позволил вывести многие разделы медицины (в частности, фармацевтику) на новый уровень.

В настоящем обзоре мы делаем попытку осветить возможности одной из наиболее важных метабономических технологий, а именно использование спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в современной фармацевтике. Учитывая сложность (для специалистов в области спектроскопии) используемой терминологии, мы в конце статьи приводим краткий словарь необходимых терминов.

1. Метабономика как отдельная наука

Существенный вклад в становление метабономики как науки был сделан профессором Джереми Николсоном, сотрудником Имперского колледжа Лондона. Начиная с 80-х годов XX в. Дж. Николсон активно развивает методические возможности метабономики, расширяет спектр приложений этой науки. Он является автором более 500 работ, посвященных этому направлению. Его сотрудники, Дж. Линдон и Е. Холмс, также весьма плодотворны. В настоящее время известны по крайней мере две монографии, целиком посвященные метабономике [1, 2].

Метабономика представляет собой междисциплинарную науку. Она в существенной степени использует физические дисциплины, поскольку в основе практических технологий лежат мощные современные спектральные методы, а также химию (органическую и химию природных соединений), так как существенным является знание разнообразных химических структур, и конечно медицину, поскольку основное направление приложений метабономики – это медицинская диагностика. Это обстоятельство накладывает серьезные требования к специалистам

в этой области. В одной из лекций Дж. Николсон говорил о том, что его личный успех в основном связан с двойным образованием – он защитил диссертации и по спектроскопии как физик, спектроскопист, и по медицинской диагностике как медик. Для ознакомления с работами группы Николсона можно порекомендовать несколько важных обзоров в этой области [3–5].

Другой серьезной английской группой, работающей в области метабономики, является группа Джулиана Гриффина (факультет биохимии, Кембриджский университет, Великобритания) (см., например, работу [6]). Работы в области метабономики проводятся также в Нидерландах (группа Х. Кима, см. работу [7]). В Финляндии активно работает группа М. Ала-Корпела (Технический университет, г. Хельсинки) (см., например, обзор [8]), в Португалии – группа под руководством Аны Гил (см., например, [9]). В США есть несколько групп, занимающихся метабономикой (см. работы группы Н. Серковой (например, [10]), а также Ю. Никольского (например, [11]) и Э. Сели [12]).

С 2005 г. выпускается специальный журнал, посвященный проблемам метабономики (см., в частности, вступительную статью Р. Гудэкра [13]). Функционирует метабономическое общество (Metabonomic Society). Большое внимание проблемам метабономики уделяет фирма Bruker, которая подчеркивает прикладное значение работ в этой области и необходимость во внедрении новых технических достижений (см., например, одну из работ сотрудника фирмы М. Шпрауля [14]). Проявляют интерес к проблемам метабономики и фирмы, занимающиеся программным обеспечением (см., например, работу, выполненную фирмой ACD Labs [15]).

К сожалению, в России метабономические исследования находятся в зародышевом состоянии. В Московском государственном университете (химический факультет, факультет фундаментальной медицины, лаборатория магнитной томографии и спектроскопии) работает группа ученых (см. работы этой группы [16, 17]). Под руководством В.П. Кутышенко работает группа в Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН в г. Пущино Московской области (см. работы [18, 19]).

2. Метабономика и метаболомика

Использование аналитических методов ГЖХ, МС, ВЭЖХ и ЯМР привело к появлению двух новых для медицины понятий – метабономика и метаболомика. Эти термины появились параллельно с такими терминами, как геномика (предмет исследования – геном человека), транскриптомика (предмет исследования – активность рибонуклеиновых кислот) и протеомика (предмет исследования – синтез белков и клеточная сигнализация). Предметом исследования метабономики и метаболомики является реакция живых организмов на внешние воздействия (например, на введение лекарств, воздействие токсичными препаратами, заболевания, изменение режима питания и т. д.). Эти реакции регистрируются как «метаболический отклик организма» – изменение состава и концентраций метаболитов и биомаркеров, которые, как правило, представляют собой органические соединения с молекулярной массой до 2 кДа. Относительно определения предмета исследований каждой из этих двух новых наук (метаболомика и метабономика) в литературе существуют некоторые разногласия. Например, ряд авторов считает, что предмет метаболомики – каталогизация и количественное определение совокупности небольших молекул, обнаруживаемых в биологических жидкостях, в зависимости от состояния донора, а предмет метабономики – изучение того, как меняется метаболический профиль сложных биологических систем в ответ на какие-либо изменения (развитие заболевания в организме, прием лекарственных препаратов, смена диеты, возрастные изменения и т. д.). Другая группа исследователей

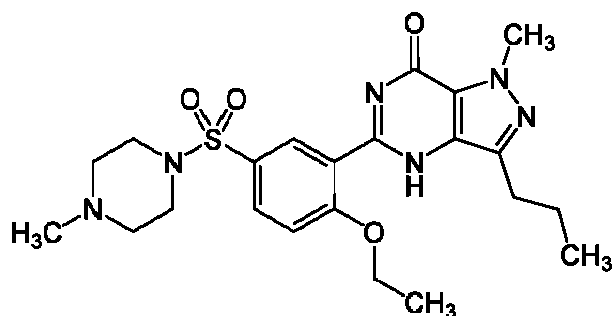


Рис. 1. Структура силденафила

считает, что метабономика изучает метаболизм человека и животных, в то время как метаболомика – метаболизм клеток и растений.

Впрочем, можно отметить, что оба термина – метабономика и метаболомика – фактически являются синонимами. Конкретное употребление этих терминов связано с групповыми соображениями – в школе Дж. Николсона (он, его ученики и последователи – Дж. Линдон, Е. Холмс, И. Уилсон) введен термин «метабономика». Дж. Гриффин, М. Ала-Корпела, Х. Ким, А. Гил и др. придерживаются термина «метаболомика».

3. Поддельные лекарства (на примере препарата «Виагра»)

В настоящее время в мире в целом и в Российской Федерации в частности подделка и незаконное производство лекарств является серьезной социальной и экономической проблемой. В соответствии с установками Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [20] такое производство представляет угрозу для потребителей, и, кроме того, подрывает основы цивилизованного рынка.

Поэтому выявление поддельных или незаконно произведенных лекарств является важной практической задачей. В этом отношении очень интересна работа французской группы (руководитель – М. Мале-Мартино [21]) из Университета Поля Сабатье (г. Тулуза). Была поставлена проблема изучения подделок довольно широко известного лекарства класса «Виагра». Этот препарат был вначале заявлен фирмой Pfizer под названием (sildenafil) силденафил (или 1-[[3-(6,7-Дигидро-1-метил-7-оксо-3-пропил-1H-пиразоло[4,3-альфа] пиримидин-5-ил)-4-этоксифенил]сульфонил] пиперазина цитрат) На рис. 1 изображена его структура.

Первоначально (в 1998 г.) препарат позиционировался как лекарственное средство для увеличения потенции. Еще немаловажно, что в фармакологии химически идентичные препараты этого типа часто выпускаются под разными коммерческими названиями. «Конегра», «Сиамгра», «Дженамгра», «Потенциале», «Пенимекс» и др. – примеры различных коммерческих названий этого препарата. Значительная доля данных препаратов выпускается в Индии. Этот типично маркетинговый ход делается для того, чтобы скрыть истинную «родословную» лекарства и создать иллюзию самостоятельности производства. Отсюда парадокс – разных лекарств тысячи, а на самом деле оригинальных лекарств очень мало. Лекарственное действие виагры основано на подавлении фосфодиэстеразы (phosphodiesterase)-фермента типа 5 (PDE-5). Известно, что подделки прибывают из стран Азии (чаще всего из Индии и Китая), которые не признают европейских и американских патентных прав, так что продукты, произведенные законным путем в этих странах, становятся незаконными в Европе, США и других странах, признающих европейские и американские патентные права. Однако люди могут легко приобретать такие

незаконно распространяемые лекарства (в частности, таблетки виагры) через многочисленные веб-сайты, которые появляются в Интернете без указания происхождения препарата.

В работе [3] для решения проблемы подделок препаратов виагры были использованы такие методики спектроскопии ЯМР, как 2D DOSY и 3D DOSY-COSY ^1H . Было изучено 17 различных видов этого лекарства, выпускаемых под названиями «Виагра» (фирма Pfizer, Франция), Progra или Silagra (фирма Cipla, Индия), Kamagra (фирма Ajanta Pharma Ltd, Индия), Manly (фирма Cooper Pharma, Индия), Sildenafil (неизвестной компании, Индия), Caverta (фирма Ranbaxy, Индия), Penegra (фирма Zydus Alidac, Индия), Extra (фирма Alpha, Сирия), Vega (фирма Asia Pharmaceutical ind., Сирия), Vega (продаваемая компанией MTM EXPORTS, страна происхождения неизвестна), Sex power (неизвестная фирма, Китай), King IX boost (фирма HONGKONG TIANLONG, Китай).

Спектры ЯМР были зарегистрированы на спектрометре Bruker AVANCE 500 (частота 500.13 МГц) с использованием протонного криодатчика для 5 миллиметровых ампул при 298 К. Основные параметры регистрации спектров: время выборки 1.64 с, ширина спектра 10 кГц, длительность импульса 3 мкс (угол поворота вектора намагниченности $\approx 35^\circ$), релаксационная задержка 2 с, число сканов 128. Для каждого из образцов было проведено 3 измерения. На основании полученных спектров было показано, что подделки и различные имитации истинного препарата легко обнаруживаются по различным наполнителям и добавкам, что позволяет получить глобальный метаболический профиль препарата для каждого производителя. Обнаружен эффект передозировки для ряда образцов. Было также показано, что препараты, произведенные в Китае, загрязнены за счет примесей варденафила и гомосилденафила. Установлено, что трехмерные спектры ЯМР DOSY-COSY ^1H дают эффект разделения компонент раствора и характеризацию компонент по химическим сдвигам для изученных образцов.

4. Примеси в лекарствах (на примере исследования гепарина)

Важное техническое и медицинское значение имеет также наличие в лекарствах примесей. Вопрос о химической чистоте представляет интерес с точки зрения количественного анализа. В принципе здесь нет абсолютных границ: так, например, в каждом органическом соединении, к которым относятся практически все лекарства, имеется примесь изотопомерных веществ – соединений, содержащих изотопы углерода (^{13}C на уровне 1.1%) или изотопы дейтерия (^2D на уровне 0.015%). Ситуация еще более осложняется при учете молекул, содержащих два редких изотопа (например, ^{13}C и ^2D или два ^{13}C).

Что касается анализа на наличие примесей, важно измерить загрязнения препарата веществами, вызывающими побочные эффекты (кроме основного терапевтического) или вообще являющимися токсинами. Так, например, в литературе (см., например, ссылки в [22, 23]) обсуждается производство гепарина (рис. 2), загрязненного хондроитин сульфатом (рис. 3), примесь которого привела к смерти более чем 100 пациентов, что заставило фармакопейный союз США (USP) ввести поправки в соответствующие нормативы. Согласно рекомендациям USP [22] для коммерческого распространения гепарина продукцию необходимо анализировать методом спектроскопии ЯМР ^1H . В полученных спектрах интегральные интенсивности сигналов примесного хондроитин сульфата, дерматан сульфата (см. рис. 4), а также примесных этилового и метилового спиртов (они также видны на спектре – см. рис. 5) не должны превышать 4% от интенсивностей сигналов основного вещества.

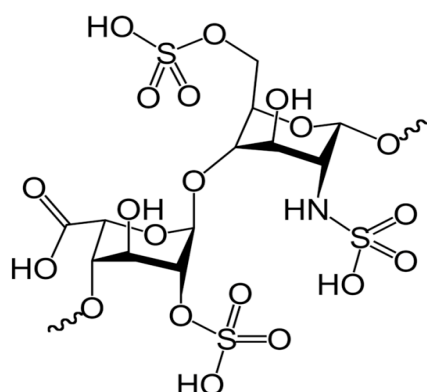


Рис. 2. Структура гепарина. Гепарин – кислый серосодержащий гликозаминогликан; впервые был выделен из печени. В клинической практике известен как прямой антикоагулянт, то есть как вещество, препятствующее свертыванию крови. Применяется для профилактики и терапии тромбозов, при операциях на сердце и кровеносных сосудах, для поддержания жидкого состояния крови в аппаратах искусственного кровообращения и гемодиализа, а также для предотвращения свертывания крови при лабораторных исследованиях

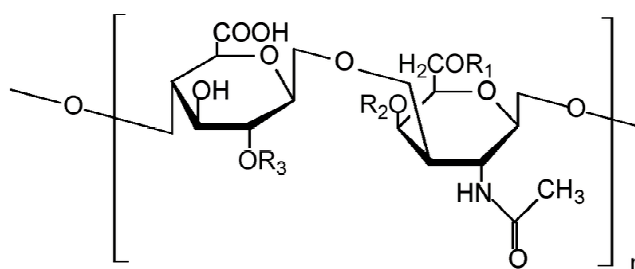


Рис. 3. Структура хондроитин сульфата. Хондроитин сульфаты – полимерные сульфатированные гликозаминогликаны, являются специфическими компонентами хряща, вырабатываются хрящевой тканью суставов, входят в состав синовиальной жидкости

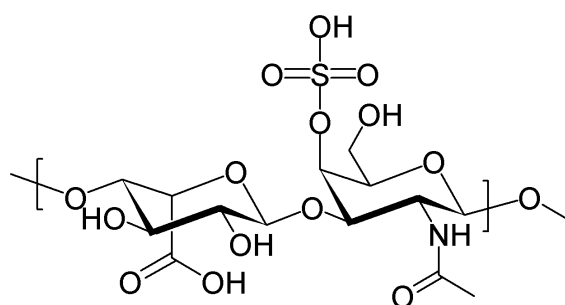


Рис. 4. Структура дерматан сульфата. Дерматан сульфат – это гликозаминогликан, обнаруживаемый в тканях кожи, в сосудах крови и сухожилиях

5. Метабономика и статистическая обработка

В настоящее время на практике огромное распространение получили различные статистические методы обработки данных. Эти методы фактически позволяют

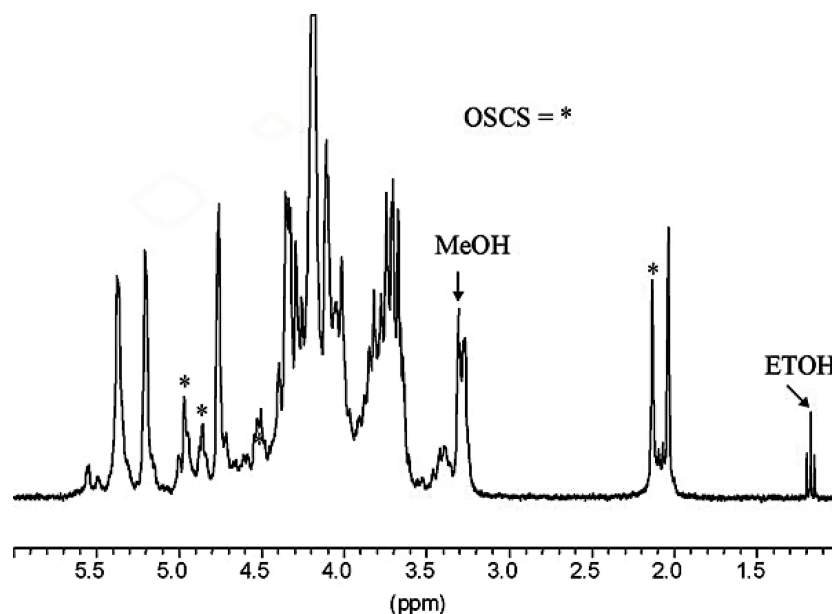


Рис. 5. Спектр ЯМР ^1H нефракционированного образца гепарина, содержащего сверхсульфированный хондроитин сульфат (OSCS, соответствующие сигналы отмечены звездочками), дерматан сульфат (ДС), а также метанол MeOH и этанол ЕТОН) (из [23]). Единицы по оси абсцисс ррш (м.д.)

на сложных проблемах уменьшить количество переменных (например, количество метаболитов, участвующих в анализе) и упростить анализ их взаимодействия. Такая процедура в статистике называется факторным анализом (или методом главных компонент – principle component analysis (PCA)). В ряде случаев этот метод позволяет разделить все множество образцов (или пациентов) на отдельные группы. Как правило, в таком факторном анализе участвует некая контрольная группа (или здоровые пациенты без патологий) и группы пациентов с различными заболеваниями или с различными формами одного и того же заболевания. В качестве примера приведем данные статистического анализа образцов мочи крыс, которым вводили токсиканты различного профиля (гепатотоксиканты (CCl_4 и α -нафтилизотиоцианат (ANIT)) и нефротоксиканты (4-аминофенол (PAP) и 2-бромэтиламин (BEA)) (см. работу [24]) (рис. 6).

Образцы обнаруживают не только явное различие в метаболических профилях крыс, подвергнутых токсикозам, и здоровых неинфицированных крыс. Выявлены также различия для отдельных групп токсикантов.

Подчеркнем, что при проведении статистической обработки нужно быть осторожным в выводах. В качестве общих рекомендаций укажем следующие правила:

- 1) выборки данных (общая, контрольная, по группам данных – пациентов или заболеваний) должны быть достаточно большими;
- 2) при удалении некоторой части данных (до 25%) выводы статистического анализа не должны существенно меняться;
- 3) сами полученные выводы (например, факторы в методе факторного анализа) следует скорее рассматривать не как окончательные выводы, а как гипотезы, требующие дальнейшей проверки.

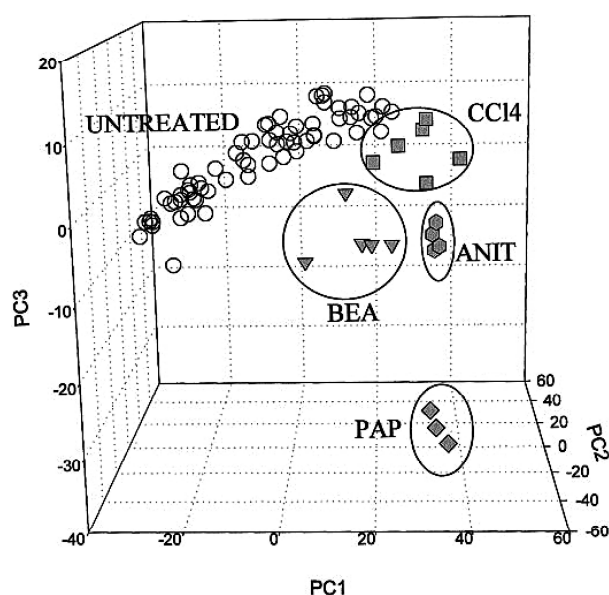


Рис. 6. Факторный анализ спектров ЯМР ^1H образцов мочи крыс (Wistar rats), которым вводили два известных гепатотоксиканта и два известных нефротоксиканта. Образцы для неинфицированных крыс показаны в виде незаштрихованных кружочков. Образцы для инфицированных крыс показаны в виде заштрихованных фигур: квадратики – CCl_4 , шестиугольники – α -нафтилизотиоцианат ANIT, ромбики – 4-аминофенол PAP и треугольники – 2-бромэтиламин BEA. Диаграмма представлена в пространстве трех главных факторов PC1, PC2 и PC3

6. Селективность и неселективность

При выборе аналитического метода изучения метабономических профилей и решении различных прикладных проблем большое значение имеет правильный выбор метода. И здесь важна такая характеристика метода, как селективность. Метод ЯМР (особенно в рутинных экспериментах) является неселективным методом, что позволяет сразу сканировать и отслеживать множество соединений. В то же время в некоторых случаях становится важным селективное выделение какой-то одной компоненты, которая может служить биомаркером какого-либо процесса (или заболевания). Это, как правило, позволяет существенно повысить чувствительность для выбранной компоненты и отслеживать более тонкие детали процесса (протекание заболевания, влияние определенной терапии, реакции на прием лекарств и т. д.). При селективном выделении хорошие результаты достигаются с помощью хроматографии.

В последние годы определенные успехи были достигнуты с помощью различных комбинационных (или гибридных) методик, таких, как ВЭЖХ-ЯМР, ЯМР-МС, ВЭЖХ-ЯМР-МС и других, сочетающих возможности метода ЯМР с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) или масс-спектрометрией (МС) (см., например, работы [26, 27]). Впрочем, соответствующая аппаратура для этих методик довольно дорога, и с учетом ограничений использования таких методик эксплуатация этой техники становится весьма проблематичной.

7. Чувствительность метода

Для практических целей очень важен такой параметр метода, как чувствительность. Ее определяют как предельно обнаруживаемую концентрацию определен-

Табл. 1

Предельные обнаруживаемые концентрации (ПОК)
для различных методов

Метод	ПОК (моль)
Флуоресценция	$10^{-18} - 10^{-23}$
Масс-спектрометрия	$10^{-13} - 10^{-21}$
Электрохимия	$10^{-15} - 10^{-19}$
Радиохимия	$10^{-14} - 10^{-19}$
УФ-спектрометрия	$10^{-13} - 10^{-16}$
ЯМР	$10^{-9} - 10^{-11}$

ного вещества. В табл. 1 по данным, заимствованным из обзора [28], приведены предельные концентрации для нескольких методов, включая спектроскопию ЯМР.

Из этих данных следует, что метод ЯМР является одним из самых малочувствительных методов, реально обнаруживаемое количество вещества составляет около 10^{-10} моль, что для молекулы с молекулярной массой 100 будет составлять 0.01 мкг, или 10 нг.

Несмотря на то что пороговая чувствительность в ЯМР невысока, она является вполне достаточной для многих практических задач. Например, возможно обнаружить воду в органических растворителях на вполне практически значимых уровнях. Так, примесь воды в бензоле (молекулярная масса 78) на уровне 10 нг означает обнаружение воды на уровне $10^{-6}\%$, то есть уровне, достаточном для контроля осушки большинства растворителей.

Краткий словарь терминов по метабономике (метаболомике)

Анализ фальсификатов (аутентификация) (*counterfeit analysis*) – анализ подозрительных лекарств путем сравнения их различных характеристик с соответствующими данными компьютерных баз по лекарственным препаратам.

Апоптоз – программируемая клеточная смерть, регулируемый процесс самоликвидации на клеточном уровне, в результате которого клетка фрагментируется на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Одной из основных функций апоптоза является уничтожение дефектных (поврежденных, мутантных, инфицированных) клеток.

Апоптотические клетки (*apoptotic cells*) – клетки высокой плотности, для которых наблюдается кариопикноз (сморщивание клеточного ядра в виде конденсации его хроматина из-за потери воды) и эозинофилия (состояние, при котором наблюдается абсолютное или относительное повышение числа эозинофилов). Такие клетки обычно находятся внутри эпителия, подвергнувшегося апоптозу.

Внутриклеточная спектроскопия ЯМР (*in cell NMR spectroscopy*) – исследование методом ЯМР протеинов внутри клетки, их локализации и конформационного состояния.

Геномика (*genomics*) – систематическое изучение генома организма, включая структурные гены, регуляторные последовательности и некодированные сегменты ДНК, а также изучение влияния генома на биологические маршруты, сети и функции.

Ксенобиотик – соединение, которое чужеродно эндогенным процессам в организме. Ксенобиотик не имеет никакой биологической функции, но может оказывать эффект на контроль эндогенных маршрутов и способен интенсивно подвергаться метаболизму комплексами собственных энзимных систем.

Ксенометаболом (*xenometabolome*) – совокупность всех неэндогенных соединений (лекарства и их метаболиты, яды, пищевые компоненты, растительные лекарственные препараты и т. д.) в биожидкостях.

Международная Фармакопея – издаваемый Всемирной организацией здравоохранения сборник официальных руководящих документов, позволяющих обеспечивать контроль качества лекарственных препаратов во всем мире. Основная цель – достижение единства при спецификации качества для выбранных фармацевтических препаратов, вспомогательных веществ и дозированных форм во всем мире.

Метаболический маршрут, метаболическая сеть (*metabolic network*) – схема реакций с участием метаболитов, определяющих физиологические и биохимические свойства клетки.

Метаболит – низкомолекулярное соединение (обычно до 1 кДа), существующее в биологическом окружении и принимающее участие в метаболических процессах роста и нормального функционирования клетки.

Метаболом – совокупность всех метаболитов, являющихся конечным продуктом обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме.

Метаболомика (*metabolomics*) – область науки, изучающая метаболические интермедиаты (и их концентрации), которые, в свою очередь, являются предшественниками всех клеточных компонентов.

Метаболический фенотип (*metabolic phenotype*) – совокупность характеристик метаболома, присущих индивиду на определенной стадии развития.

Метабономика (*metabonomics*) – «количественное измерение динамического многопараметрического метаболического отклика живых систем на патофизиологические воздействия или генные модификации». Этот термин, впервые предложенный и использованный Джереми Николсоном, употребляется в токсикологии, диагностике заболеваний и ряде других областей. Исторически метабономический подход был одной из первых попыток применить приемы системной биологии для изучения метаболизма.

Невосприимчивость к лекарственным средствам (*drug resistance*) – отторжение лекарства организмом, потеря целевого эффекта от лекарства и неэффективность при его использовании.

Модель Пачинко (*Pachinko model*) – модель для иллюстрации ксенобиотического метаболизма у человека, при котором выход ксенобиотика является результатом серии вероятностных взаимодействий с эндогенными и сим-эндогенными элементами.

Пребиотики (*prebiotics*) – пищевые ингредиенты, которые не перевариваются ферментами человека и не усваиваются в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, но стимулируют рост и жизнедеятельность полезной микрофлоры.

Пробиотики (*probiotics*) – средства, восстанавливающие микробиоценозы. Это апатогенные для человека бактерии, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно патогенных бактерий и обеспечивающие восстановление нормальной микрофлоры.

Протеомика – наука, основным предметом которой является изучение белков и их взаимодействий в живых организмах. Протеомика изучает синтез белков в организме, их декомпозицию и замену белков внутри тела, а также модификацию белков после их синтеза в организме.

Системная биология (*systems biology*) – исследование и моделирование свойств сложных биологических систем, которые нельзя объяснить суммой свойств

ее составляющих. Системная биология изучает взаимодействие различных носителей биологической информации (ДНК, РНК, белки, клетки, органы, метаболические пути и т. д.) в биологических системах с целью выяснения того, как это взаимодействие определяет функции и поведение биологических систем.

Транскриптомика (*transcriptomics*) – идентификация всех матричных РНК, кодирующих белки, определение количества каждой индивидуальной РНК и определение закономерностей экспрессии всех генов, кодирующих белки.

Фармако-метабономика (*Pharmaco-metabonomics*) – предсказание того, как индивидуальный организм будет реагировать на применение лекарств. Метод заключается в исследовании метаболитов (метаболического профиля), образующихся в данный период времени в результате протекающих в организме биохимических реакций, происходящих вследствие приема лекарств, и сравнении этого профиля с профилем, полученным до приема лекарства.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 09-04-00867).

Summary

N.M. Sergeyev, K.F. Sheberstov, V.N. Torocheshnikov, N.D. Sergeyeva. NMR Spectroscopy, Metabonomics and Biopharmaceutics.

The main fields of application of NMR spectroscopy for studying metabonomic profiles of biological fluids are analyzed. Comparative characteristics of various methods for metabonomic investigation of the structure of biological fluids from the point of view of sensitivity and selectivity are given. It is shown that NMR spectroscopy can be effectively used in pharmaceutics to identify the authenticity of drugs and when searching for impurities.

Key words: NMR, metabonomics, pharmaceutics.

Литература

1. The handbook of metabonomics and metabolomics / Eds. J.C. Lindon, J.K. Nicholson, E. Holmes. – Elsevier, 2007. – 572 p.
2. Metabolomics: methods and protocols / Ed. by W. Weckwerth. – Humana Press Inc., 2007. – 312 p.
3. Holmes E., Wilson I.D., Nicholson J.K. Metabolic phenotyping in health and disease // Cell. – 2008. – V. 134, No 5. – P. 714–717.
4. Coen M., Holmes E., Lindon J.C., Nicholson J.K. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology // Chem. Res. Toxicol. – 2008. – V. 21, No 1. – P. 9–27.
5. Beckwith-Hall B.M., Nicholson J.K., Nicholls A.W., Foxall P.J., Lindon J.C., Connor S.C., Abdi M., Connelly J., Holmes E. Nuclear magnetic resonance spectroscopic and principal components analysis investigations into biochemical effects of three model hepatotoxins // Chem. Res. Toxicol. – 1998. – V. 11, No 4. – P. 260–272.
6. Griffin J. The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2006. – V. 361, No 1465. – P. 147–161.
7. Kim H.K., Wilson E.G., Choi Y.H., Verpoorte R. Metabolomics: a tool for anticancer lead-finding from natural products // Planta. Med. – 2010. – V. 76, No 11. – P. 1094–1102.
8. Ala-Korpela M. Potential role of body fluid ^1H NMR metabonomics as a prognostic and diagnostic tool // Expert Rev. Mol. Diagn. – 2007. – V. 7, No 6. – P. 761–773.

9. Duarte I.F., Marques J., Ladeirinha A.F., Rocha C., Lamego I., Calheiros R., Silva T.M., Marques M.P., Melo J.B., Carreira I.M., Gil A.M. Analytical approaches toward successful human cell metabolome studies by NMR spectroscopy // *Anal. Chem.* – 2009. – V. 81, No 12. – P. 5023–5032.
10. Serkova N.J., Spratlin J.L., Eckhardt S.G. NMR-based metabolomics: translational application and treatment of cancer // *Curr. Opin. Mol. Ther.* – 2007. – V. 9, No 6. – P. 572–585.
11. Nikolsky Yu., Nikolskaya T., Bugrim A. Biological networks and analysis of experimental data in drug discovery // *Drug Discov. Today.* – 2005. – V. 10, No 9. – P. 653–662.
12. Seli E., Botros L., Sakkas D., Burns D.H. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization // *Fertil. Steril.* – 2008. – V. 90, No 6. – P. 2183–2189.
13. Goodacre R. Metabolomics – the way forward // *Metabolomics.* – 2005. – V. 1, No 1. – P. 1–2.
14. Spraul M., Schütz B., Humpfer E., Mörtter M., Schäfer H., Koswig S., Rinke P. Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control // *Magn. Reson. Chem.* – 2009. – V. 47, Suppl. 1. – P. S130–S137.
15. Golotvin S., Williams A. Improved baseline recognition and modeling of FT NMR spectra // *J. Magn. Res.* – 2000. – V. 146, No 1. – P. 122–125.
16. Колоколова Т.Н., Савельев О.Ю., Сергеев Н.М. Метаболический анализ биологических жидкостей человека на основе спектроскопии ЯМР ^1H // *Журн. анал. химии.* – 2008. – Т. 63, № 2. – С. 118–136.
17. Колоколова Т.Н., Савельев О.Ю., Сергеев Н.М., Шпигун О.А., Соколов К.В., Скворцова В.И. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса в решении аналитических задач медицины. Анализ цереброспинальной жидкости // *Журн. анал. химии.* – 2010. – Т. 65, № 10. – С. 1096–1105.
18. Кутышенко В.П., Свиридова-Чайлахан Т.А., Молочков Н.В., Чайлахан Л.М. Исследование методом ЯМР высокого разрешения состава органических соединений репродуктивных органов самцов мышей // *Докл. РАН.* – 2008. – Т. 420, № 1. – С. 124–129.
19. Кутышенко В.П., Свиридова-Чайлахан Т.А., Степанов А.А., Чайлахан Л.М. Исследование состава органических соединений в ранних зародышах мышей методом протонного магнитного резонанса // *Докл. РАН.* – 2008. – Т. 422, № 3. – С. 405–409.
20. Counterfeit Drugs. Guidelines for the development of measures to combat counterfeit drugs. – Geneva, Switzerland: Department of Essential Drugs and Other Medicines, World Health Organization, 1999. – 62 p. – URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_EDM_QSM_99.1.pdf.
21. Trefi S., Gilard V., Balayssac S., Malet-Martino M., Martino R. The usefulness of 2D DOSY and 3D DOSY-COSY ^1H NMR for mixture analysis: application to genuine and fake formulations of sildenafil (Viagra) // *Magn. Reson. Chem.* – 2009. – V. 47, Suppl. 1. – P. S163–S173.
22. Holzgrabe U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* – 2010. – V. 57, No 2. – P. 229–240.
23. Beyer T., Diehl B., Randel G., Humpfer E., Schafer H., Spraul M., Schollmayer C., Holzgrabe U. Quality assessment of unfractionated heparin using ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – V. 48, No 1. – P. 13–19.

24. *Robertson D.G., Reily M.D., Sigler R.E., Wells D.F., Paterson D.A., Braden T.K.* Metabonomics: evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid in vivo screening of liver and kidney toxicants // *Toxicol. Sci.* – 2000. – V. 57, No 2. – P. 326–337.
25. *Schaber G., Wiatr G., Wachsmuth H., Dachtler M., Albert K., Gaertner I., Breyer-Praf U.* Isolation and identification of clozapine metabolites in patient urine // *Drug Metab. Dispos.* – 2001. – V. 29, No 6. – P. 923–931.
26. *Peng S.X.* Hyphenated HPLC-NMR and its applications in drug discovery // *Biomed. Chromatogr.* – 2000. – V. 14, No 6. – P. 430–441.
27. *Quinones M.P., Kaddurah-Daouk R.* Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases // *Neurobiol. Dis.* – 2009. – V. 35, No 2. – P. 165–176.
28. *Lacey M.E., Subramanian R., Olson D.L., Webb A.G., Sweedler J.V.* High-resolution NMR spectroscopy of sample volumes from 1 nL to 10 μ L // *Chem. Rev.* – 1999. – V. 99, No 10. – P. 3133–3152.

Поступила в редакцию
17.01.12

Сергеев Николай Михайлович – доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

E-mail: sergeyev@nmr.chem.msu.ru

Шеберстов Кирилл Федорович – студент факультета наук о материалах Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

E-mail: kirillsheb@gmail.ru

Торочешников Владимир Николаевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

E-mail: Vl.Tor@nmr.chem.msu.ru

Сергеева Наталья Дмитриевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

E-mail: nsergeyeva@org.chem.msu.ru